

Technika macierzy dołkowych

Laboratorium w kropelce



PIOTR GARSTECKI

Instytut Chemii Fizycznej, Warszawa

Polska Akademia Nauk

garst@ichf.edu.pl

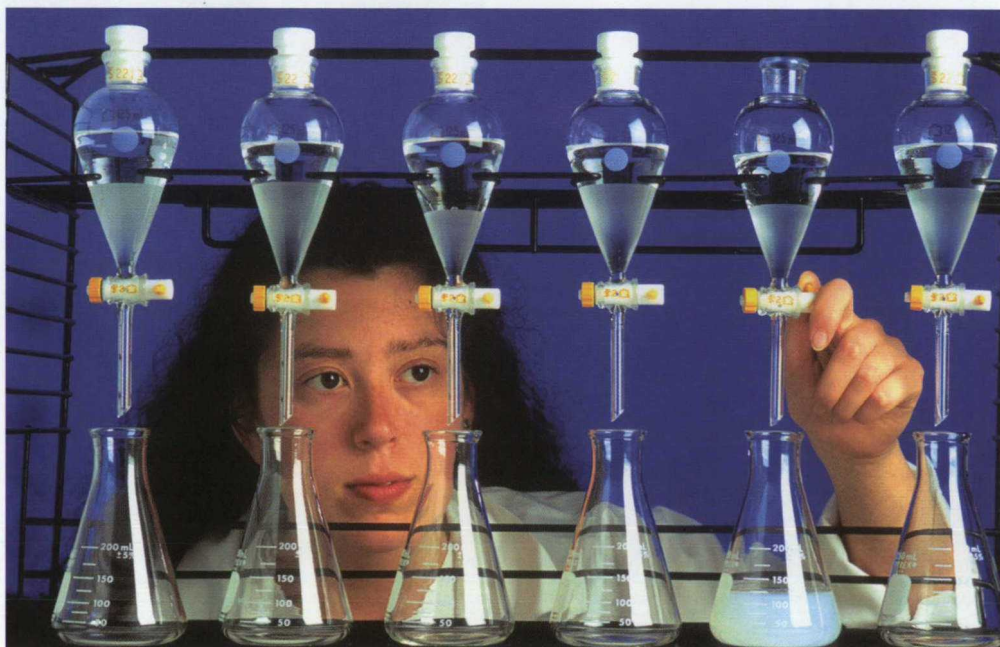
Doc. dr hab. Piotr Garstecki prowadzi grupę badawczą Mikroprzepływów i Płynów Złożonych w IChF PAN

Od kilku lat naukowcy potrafią prowadzić reakcje chemiczne i biochemiczne wewnątrz mikrokropelek tworzonych i analizowanych w kanałach mikrolaboratoriów. Automatyzacja tych technik może zaowocować rewolucją w badaniach chemicznych i biologicznych

Pracę naukową odruchowo kojarzymy z kartką, ołówkiem i głębokim namysłem, podczas gdy robotyka i automatyzacja pracy kojarzy nam się raczej z produkcją przemysłową. Chociaż wzory matematyczne i zastanowienie nie przestają być podstawowym narzędziem rozwoju naszego zrozumienia świata i zjawisk, często kluczem do po-

stępu jest nabór i analiza ogromnej ilości danych doświadczalnych. Dotyczy to zwłaszcza nauk biologicznych. Dla przykładu poznanie kodu genetycznego poszczególnych organizmów pozwala nam, poprzez analizy porównawcze, na lepsze poznanie historii ewolucji i zrozumienie jej mechanizmów. Sekwencjonowanie indywidualnych genomów ludzi, po skorelowaniu ich z ich historiami chorób może doprowadzić do rewolucji w medycynie i opracowaniu indywidualnych strategii profilaktycznych i terapeutycznych. Podobnie w biologii systemowej, która traktuje żywe komórki i organizmy jak skomplikowane układy funkcjonalnych modułów, nasze zrozumienie i stworzenie podstaw inżynierii wymaga naboru ogromnej ilości danych o reakcjach chemicznych zachodzących wewnątrz komórek i o ich wzajemnych powiązaniach. W przemyśle farmaceutycznym poszukiwanie nowych leków najczęściej sprowadza się do żmudnych badań, w których wyznacza się powinowactwo małych cząsteczek chemicznych do białek, które pełnią określoną funkcję w metabolizmie. Chociaż istnieją teoretyczne podstawy pro-

Tradycyjnie chemię uprawia się, prowadząc reakcje w kolbach i probówkach – makroskopowych naczyniach o objętościach rzędu dziesiątków mililitrów



AKS Image Gallery

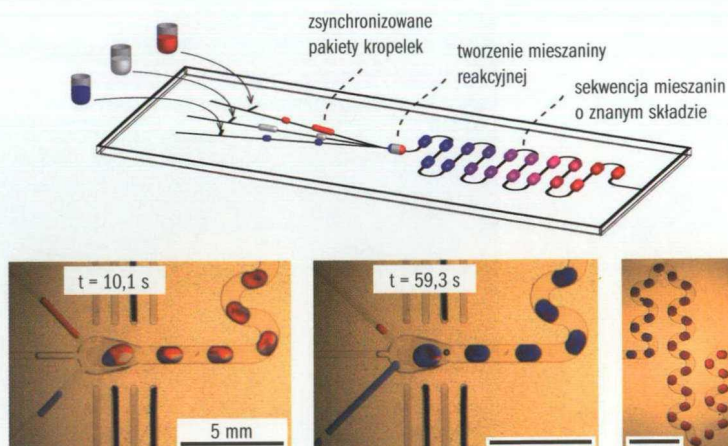
jektowania cząsteczek wykazujących wysoką reaktywność z konkretnymi białkami, metody te nadal są niewystarczające. W praktyce znalezienie nowej cząsteczki aktywnej sprowadza się do tzw. badań przesiewowych, czyli eksperymentalnego sprawdzenia oddziaływania białek z cząsteczkami chemicznymi z ogromnych bibliotek zawierających miliony różnych związków.

Macierz miniprobówek

Obecnym standardem w przesiewowych badaniach chemicznych i biochemicznych jest tak zwana technika macierzy dołkowych. Choć nazwa brzmi tajemniczo, koncepcja tego rozwiązania jest bardzo prosta. Zamiast prowadzić reakcję chemiczną w pojedynczej probówce, prowadzi się wiele reakcji jednocześnie, każdą w miniaturowym dołku wytłoczonym na płytce. Pierwsze płytki miały 96 dołków ułożonych w 8 rzędach i 12 kolumnach na powierzchni wielkości mniej więcej ludzkiej dłoni. Obecnie stosuje się płytki o gęstszym upakowaniu dołków, nawet 1536 dołków na jednej płytce. Zautomatyzowane stacje robotyczne zaciągają małe próbki reagentów i wstrzykują je do dołków. Najszybsze i najdokładniejsze roboty wykonują obecnie operacje napełnienia pojedynczego dołka w czasie kilku sekund, wykorzystując do tego objętość kilku mikrolitrów płynu (dla przypomnienia: 1 mikrolitr stanowi objętość sześcienu o boku jednego milimetra). Nakłady na badania przesiewowe są ogromne. Średni koszt pojedynczej reakcji w dołku wynosi około trzech dolarów, a przy poszukiwaniu leków w każdym dużym projekcie wykonuje się kilka milionów reakcji chemicznych.

Układy mikroprzepływowe

Na początku lat 90. naukowcy rozpoczęli badania nad konstruowaniem układów miniaturowych kanalików (o średnicach setnych lub dziesiątych części milimetra) i przepuszczaniem przez nie płynów. Przepływ w tej skali jest zdominowany przez efekty związane z lepkością płynu i, w odróżnieniu od przepływów w dużej skali, można go niezwykle precyzyjnie regulować. Dynamiczny rozwój technik mikroprzepływowych w dużej mierze napędzany był wizją, która zakłada, że w chemii i inżynierii chemicznej nastąpi rewolucja podobna do tej, która wydarzyła się w latach 70. w przemyśle elektronicznym.



nym. Naukowcy wierzą, że podobnie jak miniaturowe układy tranzystorowe zastąpiły potężne lampowe maszyny obliczeniowe, tak tradycyjne laboratoria chemiczne zostaną zastąpione układami mikroprzepływowymi.

W pierwszych latach tego wieku udało się pokazać, że można również precyzyjnie kontrolować mikroprzepływy płynów, które się ze sobą nie mieszają. W szczególności możliwe jest precyzyjne tworzenie kropelek o średnicach np. jednej setnej lub jednej dziesiątej milimetra. Objętość takich kropelek wynosi odpowiednio pikolitr i nanolitr, czyli jedną trylionową lub jedną miliardową część litra. Oznacza to, że z jednej łyżeczki płynu (objętości kilku mililitrów) można wytworzyć od kilku milionów do kilku miliardów kropli.

Reakcje w kroplach

Mikrokropelki idealnie nadają się do wykorzystania jako miniaturowe probówki. Układy potrzebne do wytwarzania kropelek są bardzo proste i dzięki temu mogą być tanio i masowo produkowane. Przepływ napędzany jest różnicą ciśnień. Dzięki temu można uniknąć stosowania np. pól elektrycznych, które mogłyby uszkodzić odczynniki biochemiczne lub które ograniczają zakres płynów, którymi można manipulować. Dodatkowo mikroprzepływowe techniki kropelkowe zapewniają ultraszybkie mieszanie reagentów, eliminują niedokładność związaną z różnym czasem przebywania reagentów w konwencjonalnych reaktorach przepływowych, oferują doskonałą kontrolę nad warunkami oraz kinetyką reakcji chemicznych. A wszystko to przy minimalnym zużyciu reagentów i przy doskonałej statystyce pomiarów dzięki możliwości bardzo szybkich powtórzeń tej samej reakcji.

Układ mikroprzepływowy, który z prędkością 3 Hz miesza w zadanych (i dowolnych) proporcjach trzy roztwory. Mikrografie pokazują łączenie kropli w mieszaniny reakcyjne. Fotografia po prawej przedstawia cały układ z sekwencją mieszanin o różnych proporcjach czerwonego i niebieskiego atramentu

Technika macierzy dołkowych

Płytki dołkowe zawierające 96, 384 i 1536 pojemników reakcyjnych



Wikipedia: S.D. Hamilton

W ciągu ostatnich kilku lat naukowcy pokazali bardzo wiele przykładów reakcji przeprowadzonych wewnątrz kropelek na miniaturowych płytkach mikroprzepływowych. Zastosowania tych układów rozciągają się od syntezy chemicznej i inżynierii materiałowej po biochemię i mikrobiologię. Zalety prowadzenia reakcji wewnątrz kropelek pozwalają optymalizować procesy chemiczne – uzyskiwać precyzyjnie monodispersyjne nanocząstki, dokładnie dobierać warunki reakcji chemicznych czy szukać najlepszych warunków dla krystalizacji białek. Najnowsze doniesienia pokazują nawet skomplikowane reakcje biochemiczne przeprowadzone *in vitro*, w tym transkrypcję i translację materiału genetycznego, czyli syntezę białek według informacji zakodowanej w krótkich odcinkach DNA umieszczonych w mikrokropelkach. Kropelki nadają się również do prowadzenia badań mikrobiologicznych i z powodzeniem mogą zastąpić tradycyjne metody hodowli kultur bakteryjnych na szalkach Petriego.

Niestety, mikroprzepływowe techniki kropek nie są jeszcze na tyle rozwinięte, aby zastąpić techniki macierzy dołkowych. Wyzwaniem jest automatyzacja procesu tworzenia kropelek, mieszanin reakcyjnych i umożliwienie wykonywania dowolnych protokołów chemicznych. Cóż bowiem z tego, że możemy wykonać setki reakcji na sekundę, zużywając do tego jedną tysięczną mililitra, jeśli wszystkie te reakcje są dokładnie takie

same, a zmiana roztworów wymaga zużycia mililitra płynu na uruchomienie układu i zabiera np. godzinę? Aby rozwiązać te problemy, konieczne jest opracowanie technik tworzenia kropelek na żądanie oraz manipulowania kropekami na płytkach mikroprzepływowych według skomplikowanych protokołów zakodowanych i sterowanych za pomocą komputera.

Zautomatyzowane laboratoria kropekowe

W ramach badań prowadzonych w laboratorium mikroprzepływów i płynów złożonych w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, udało nam się opracować platformę technologiczną, która jest krokiem w kierunku rozwiązania powyższych problemów. Zaletą rozwiązania jest jego modularność. W odróżnieniu od innych prób automatyzacji mikroukładów kropekowych, nasz układ oparliśmy nie na mikrozaworze zintegrowanym z płytką mikroprzepływową, lecz na zewnętrznym zaworze elektromagnetycznym, połączonym z układem cienką kapilarą. To proste rozwiązanie umożliwiło nam wykorzystanie tanich, typowych zaworów nieprzeznaczonych do dozowania miniaturowych próbek płynów. Dodatkowo nowy sposób kontroli przepływu obu niemieszających się płynów (zarówno roztworu, z którego tworzone są kropelki, jak i płynu nośnego) pozwolił na pokonanie barier związanych z mechanizmem tworzenia kropli w mikroskali i na tworzenie kropek w praktycznie nieograniczonym za-

kresie objętości, z częstościami nawet kilkadziesiąt kropli na sekundę.

Tak przygotowana technika tworzenia mikrokropelek na żądanie pozwala na konstrukcję prototypowych układów do wysoko wydajnych badań przesiewowych. Na jednej płytce umieszczone są trzy źródła kropelek na żądanie. Każde z nich, niezależnie kontrolowane przez komputer, jest zasilone w inny roztwór. Wykonując protokół przesiewowy, każde źródło kropelek synchronicznie z pozostałymi tworzy krople o z góry zadanej objętości. Następnie pakiet trzech kropelek łączy się, tworząc mieszaninę reakcyjną o ustalonej objętości. Zmieniając objętości każdej z trzech kropelek tworzących ostateczną mieszaninę, kontrolujemy stężenia poszczególnych roztworów w ostatecznych mieszaninach reakcyjnych. Dzięki temu, że każda mieszanina reakcyjna jest tworzona „na żądanie”, możemy w sposób dowolny zmieniać stężenia reagentów w kolejnych kroplekach. Rycina (str. 13) pokazuje przebieg stężeń reagentów w kolejnych mieszaninach reakcyjnych, tworzonych z prędkością trzech na sekundę. Na wykresie widać, że technika ta oferuje pełną dowolność sposobu mieszania trzech składników, generowanie zarówno skokowych, jak i ciągłych zmian stężeń, jak również szybkiego przemiatawania wszystkich możliwych kombinacji stężeń reagentów.

Badania mikrobiologiczne

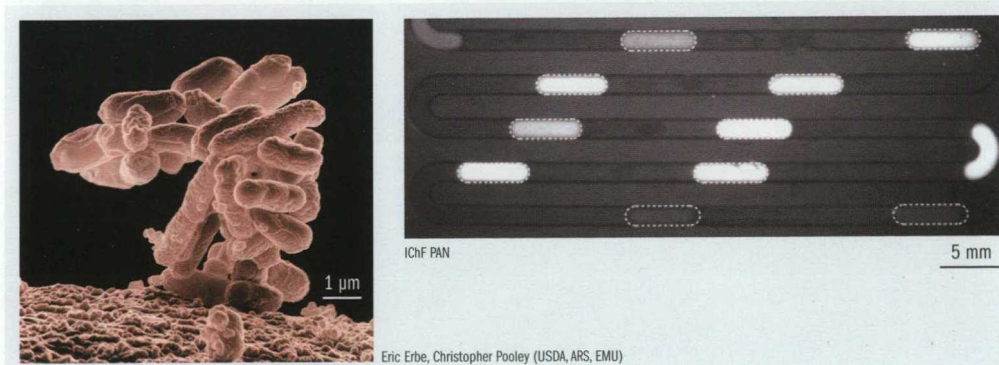
Jednym z przykładów możliwych zastosowań układów przesiewowych są badania mikrobiologiczne. Działania skojarzone antybiotyków są niesłychanie ciekawym zagadnieniem naukowym o potencjalnie bardzo istotnym znaczeniu dla praktyki medycznej. Niektóre pary antybiotyków (pary synergistyczne) mają działanie bardziej bakteriobój-

cze, niż wynikałoby z prostej sumy aktywności każdego z nich. Dla innych par działanie mieszanki antybiotyków jest słabsze niż suma ich indywidualnych aktywności (oddziaływanie antagonistyczne). Okazuje się, że – być może paradoksalnie – antagonistyczne kojarzenie antybiotyków może być szczególnie korzystne w medycynie. Jest tak dlatego, że bakterie, które uzyskały mutacje uodporniające na np. antybiotyk B, jednocześnie pozbawione są antagonistycznego działania substancji B i stają się łatwym łupem dla toksyny A. Tak zaprojektowane terapie mogłyby zapobiec powstawaniu szczepów lekoopornych. Jednak wprowadzenie tych technik do medycyny wymaga bardzo szczegółowych badań i zebrania ogromnej liczby danych na temat odpowiedzi bakterii na różne kombinacje stężeń różnych toksyn. Metody tradycyjne, oparte na hodowlach kolonii bakteryjnych na szalkach Petriego, są bardzo pracochłonne, podczas gdy pojedynczy zautomatyzowany układ mikroprzepływowy może przeprowadzić nawet kilkadziesiąt tysięcy różnych doświadczeń w ciągu jednego dnia. Mamy nadzieję, że w najbliższej przyszłości nowoczesne techniki manipulacji płynami w mikroskali diametralnie ułatwią i przyspieszą badania biologiczne z korzyścią dla naszego zrozumienia świata i dla opracowania nowych, bezpieczniejszych i skuteczniejszych terapii. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Garstecki P. (2006). Bąbelki jak w zegarku. *Academia*, 1, 23–25.
- Garstecki P. (2008). Kropelkowe liczydło. *Świat Nauki*, 6, 44–51.
- Churski K., Korczyk P., Garstecki P. (2010). High-throughput automated droplet microfluidic system for screening of reaction conditions. *Lab on a Chip*, 10, 816.

Mikrografia elektronowa bakterii Escherichia coli oraz mikrografia fluorescencyjna kropelek zawierających bakterie Escherichia coli poddane działaniu różnych stężeń ampicyliny. Sygnał fluorescencyjny pochodzi od rezorufiny – związku powstającego w metabolizmie bakterii, co pozwala ocenić poziom toksyczności danego stężenia antybiotyku



Eric Erbe, Christopher Pooley (USDA, ARS, EMU)